

**Auftrennung der alkalischen Phosphatase
in zwei Enzyme und deren Lokalisation
in der Zelle**

Claus Gösswein

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555212_0032

AUFTRENNUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE
IN ZWEI ENZYME UND DEREN LOKALISATION
IN DER ZELLE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Claus Gösswein

aus

Leipzig

1961



Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 2. 1961

Meinen lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München unter der Anleitung seines Direktors, Herrn Prof. Dr. E. Bamann, in der Zeit von Februar 1958 bis November 1960 durchgeführt.

Meinem verehrten akademischen Lehrer

Herrn Prof. Dr. E. Bamann

sage ich für die Förderung meiner Studien sowie für das mir in wissenschaftlichen und persönlichen Dingen jederzeit erwiesene Wohlwollen meinen aufrichtigen Dank.

Herrn Prof. Dr. A. Butenandt, dem Direktor des Max-Planck-Instituts für Biochemie, bin ich für die gewährte Möglichkeit der Durchführung eines Teiles meiner Versuche in seinem Institut zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Privatdozenten Dr. J. Riehl danke ich herzlichst für die ständigen Anregungen und das nicht erlahmende Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Vorbemerkung</u>	1
B. <u>Diskussion der Ergebnisse</u>	2
C. <u>Beschreibung der Versuche</u>	
I. Existenz zweier isodynamer alkalischer Phosphatasen in der Rinderleber	6
1. Auftreten mehrerer pH-Optima im alkalischen Bereich. .	6
2. Mehrere pH-Wirkungsoptima, bedingt durch die Gegen- wart zweier isodynamer alkalischer Phosphatasen.....	10
3. Charakterisierung der beiden Enzyme in ihren Haupteigenschaften	11
II. Lokalisation der beiden alkalischen Phosphatasen in der Rinderleber	19
1. Die Verteilung der isodynamen Phosphatasen innerhalb der Zelle im Lichte der bisherigen Untersuchungen	19
2. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen	20
III. Versuche zur Trennung der beiden isodynamen alkalischen Phosphatasen durch fraktioniertes Fllen mit Ammonium- sulfat	28
IV. Zur Methodik	33
D. <u>Zusammenfassung</u>	35
E. <u>Literaturverzeichnis</u>	37

A. Vorbemerkung

Eines der interessantesten Probleme der modernen Enzymologie ist die Frage nach der Lokalisation der Enzyme in der Zelle.

Die Ergebnisse solcher Untersuchungen vermögen zu zeigen, wie die verschiedenen Zonen der Zelle für die einzelnen Stufen des Stoffwechsels verantwortlich sind und wie die Regulation dieser Vorgänge innerhalb der Zelle erfolgt. Darüber hinaus gibt die Kenntnis der Lokalisation auch einen Hinweis auf die Funktionen solcher Enzyme, deren Aufgabe im Stoffwechsel noch weitgehend ungeklärt ist.

Was die Phosphatasen betrifft, so wird u. a. eine Beteiligung an der Knochenbildung, am Energiestoffwechsel und bei der Proteinsynthese angenommen; vielfach aber ist noch immer zu wenig über die Einschaltung dieser Enzyme bekannt. Beispielsweise kennt man noch nicht genügend, an welchen Gliedern der Stoffwechselkette die Phosphatasen fungieren.

In dieser Arbeit wird für die alkalische Phosphatase der Rinderleber gezeigt, dass dieses Enzym im Gegensatz zu der bisherigen Annahme aus zwei verschiedenen Phosphatasen besteht. Eine lohnende Aufgabe in dem oben genannten Bemühen erschien es uns, die beiden isodynamen alkalischen Phosphatasen zu trennen und ihre Lokalisation zu klären.

B. Diskussion der Ergebnisse

Wenn man von der feineren Charakterisierung in Lyo- und Desmo-Enzym (3) absieht, gilt bis heute die alkalische Phosphatase aus Rinderleber als ein einheitliches Enzym.

Unsere Untersuchung zeigt, dass dies nicht zutrifft; die Wirkung, die durch die Phosphatase im alkalischen Gebiet hervorgerufen wird, kommt vielmehr durch zwei verschiedene isodyname Enzyme zustande. Diese beiden Enzyme können voneinander getrennt werden.

In einer Reihe von Eigenschaften unterscheiden sich die beiden alkalischen Phosphatasen: So besitzt das eine Enzym unter den von uns gewählten Bedingungen sein Wirkungsoptimum bei pH 9.2, das andere bei pH 9.8¹⁾. Nach Zusatz von Magnesium-Ionen erfährt die 9.2-Phosphatase keine Aktivierung im Gegensatz zu dem 9.8-Enzym, dessen Wirksamkeit durch Mg-Ionen erhöht wird. Als letzte charakteristische Eigenschaft ist noch die verschieden grosse Hemmung der beiden alkalischen Phosphatasen durch Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer zu erwähnen. Die 9.8-Phosphatase wird von gewissen Pufferkonzentrationen ab stärker gehemmt als das 9.2-Enzym.

Bezüglich der Lokalisation der beiden Enzyme in der Zelle ergibt sich, dass die 9.2-Phosphatase nur an die Mikrosomen gebunden ist, während das 9.8-Enzym sowohl in der Zellkern- als auch in der Mikrosomen-Fraktion gefunden wird. Das Auftreten der 9.8-Phosphatase in der Mikrosomen-Fraktion ist möglicherweise dem Entstehen eines Artefacts zuzuschreiben, indem beim Homogenisieren angefallene Zellkern-Fragmente, die 9.8-Phosphatase führen, zusammen mit den Mikrosomen in einer Fraktion niedergeschlagen werden.

Ob die von uns in Rinderleber erstmals gefundene zweite alkalische Phosphatase auch in Organen, in denen bisher nur eine alkalische Phosphatase erkannt wurde, als Begleiterin auftritt, werden erst diesbezügliche Untersuchun-

¹⁾ Im folgenden wird für die bei pH 9.2 bzw. pH 9.8 optimal wirksamen Phosphatasen 9.2-Enzym oder 9.2 Phosphatase bzw. 9.8-Enzym oder 9.8-Phosphatase abgekürzt.

gen zeigen können. Es ist dies jedoch mit grosser Wahrscheinlichkeit anzunehmen, da die von verschiedenen Autoren mitgeteilten Ergebnisse über gereinigte alkalische Phosphatase erst unter Berücksichtigung der Existenz einer zweiten alkalischen Phosphatase zu erklären sind:

So erhielt J. C. MATHIES (13) aus Schweine-Nieren ein Präparat von 8290 Phosphatase-Einheiten/mg N nach KING, das elektrophoretisch nur einen Protein-Bestandteil erkennen lässt, während die Ultra-Zentrifuge die Anwesenheit dreier Eiweiss-Komponenten aufzeigt, von denen eine mit 80-90% vorherrscht. Ein aus Schweine-Nieren von E. F. ALVAREZ und M. L. TAMAYO (1) dargestelltes Präparat von 166000 Phosphatase-Einheiten/mg N nach ROCHE und BOUCHILLOUX ist ebenfalls nicht einheitlich. Sowohl die Elektrophorese als auch das Ultraviolett-Absorptionsspektrum zeigen zwei Bestandteile, deren mengenmässige Anteile die beiden Autoren auf 85-90% und 10-15% schätzen. Als Ursache für die zwei Absorptions Maxima bei 260 m μ und 278 m μ nehmen E. F. ALVAREZ und M. L. TAMAYO an, dass entweder ein Pyrimidin-Nucleotid - Pyrimidin-Nucleotide besitzen ein Absorptions-Maximum bei 260 m μ und Proteine bei 280 m μ - Bestandteil der alkalischen Phosphatase ist oder dass nicht nur eine alkalische Phosphatase in Schweine-Nieren vorliegt.

Aus Darmschleimhaut von Kälbern haben G. SCHRAMM und O. ARMBRUSTER (27), R. K. MORTON (16) sowie P. PORTMANN (20) hochaktive Phosphatase-Präparate bereitet - 57000 Phosphatase-Einheiten/mg N nach ROCHE und BOUCHILLOUX, bzw. 83500 Phosphatase-Einheiten/mg N nach MORTON, bzw. 440000 Phosphatase-Einheiten/mg N nach MORTON -. Alle drei Präparate sind als elektrophoretisch einheitliche Proteine charakterisiert. Das von G. SCHRAMM und O. ARMBRUSTER gewonnene Phosphatase-Präparat, das zusätzlich noch in der Ultra-Zentrifuge auf seine Einheitlichkeit untersucht wurde, zeigt bei dieser Prüfung zwei Eiweiss-Fractionen.

Die Erscheinung, dass hochaktive Enzymlösungen alkalischer Phosphatase unabhängig von der spezifischen Aktivität (Einheit/mg N) in der Elektrophorese nur einen Protein-Bestandteil erkennen lassen, kann nach P. PORTMANN (20) in zwei Ursachen begründet sein. Entweder sind die für die phosphatatische Wirkung nötigen Eiweissgruppen des Phosphatase-Moleküls durch

das Reinigungsverfahren mehr oder weniger verändert, was einen Verlust an Aktivität ohne Änderung der elektrischen Ladung des Proteins zur Folge hätte, oder es liegen verschiedene Typen von alkalischer Phosphatase mit gleicher Ladungsgrösse in praktisch reinem Zustand nebeneinander vor.

R. GRYDER, S. FRIEDENWALD und C. CARLSON (9) haben in Ratten-Nieren zwei alkalische Phosphatasen histochemisch nachgewiesen und deren Aktivitäts-pH-Kurven aufgestellt. Die beiden Phosphatasen unterscheiden sich in der Lage ihrer Wirkungsoptima - pH 9.2 bzw. pH 9.5 - in Anwesenheit von 0.016 m Glycerin- β -phosphorsäure und Veronal/Bicarbonat-Puffer. Eine Phosphatase wird durch Jodacetat gehemmt und durch Glycerin oder Zink-Ionen aktiviert, während die andere Phosphatase nicht inaktiviert und durch Mg-Ionen aktiviert werden kann.

Ein Teil dieser von R. GRYDER und Mitarbeitern mitgeteilten Eigenschaften steht zu den von uns gefundenen in Widerspruch. Die Inaktivierung der einen alkalischen Phosphatase durch Jodacetat würde auf die Anwesenheit von SH-Gruppen als aktive Zentren deuten, wie sie bei der sauren Phosphatase gefunden worden sind (25, 30). Da auch wir unsere Enzymlösungen mit einem SH-Gruppen spezifischen Reagens, p-Chlormercuri-benzoesäure, zur Inaktivierung der sauren Phosphatase vorbehandelt haben, hätten wir neben der Ausschaltung der sauren Phosphatase auch eine Inaktivierung unserer 9.2-Phosphatase, des durch Mg-Ionen nicht aktivierbaren Enzyms, feststellen müssen. Dies war aber nicht der Fall.

Die Ergebnisse der angeführten Autoren zeigen deutlich, dass bei der Reinigung der alkalischen Phosphatase immer mehrere phosphatatisch aktive Bestandteile angereichert worden sind, was zwar mittels Elektrophorese nicht immer sichtbar wurde, aber durch das Ultra-Zentrifugen-Diagramm und das UV-Spektrum erkannt werden konnte. Die elektrophoretische Einheitlichkeit der Präparate, trotz Anwesenheit von mehr als einem Bestandteil, lässt darauf schliessen, dass sich die beiden alkalischen Phosphatasen in der elektrischen Ladung ihrer Protein-Komponente nicht wesentlich unterscheiden.

Eine wichtige Voraussetzung für künftige Versuche zur Reindarstellung von alkalischer Phosphatase ist deshalb die Prüfung des Ausgangsmaterials auf

die Anzahl der vorliegenden alkalischen Phosphatasen. Dies kann geschehen durch Aufstellen einer Aktivitäts-pH-Kurve unter den von uns beschriebenen Bedingungen - 1.0 m Ammoniak/Ammoniumchlorid; 0.04 m Glycerin- β -phosphorsäure - da aus dem Verlauf dieser Kurve die Zahl der anwesenden Phosphatasen zu erkennen ist. Enzymlösungen, die nur eine alkalische Phosphatase enthalten, besitzen auch nur ein Wirkungsoptimum, das je nach dem Typ des Enzyms bei pH 9.2 bzw. pH 9.8 liegt. Bei Anwesenheit beider alkalischer Phosphatasen ist ihren mengenmässigen Anteilen entsprechend zwischen pH 9.2 und pH 10.0 entweder ein Optimum möglich oder es treten in diesem Bereich zwei bzw. drei Maxima auf.

Eine präparative Anreicherung der 9.8-Phosphatase, frei von 9.2-Enzym, dürfte auf Grund unserer Erfahrungen aus der Zellkern-Fraktion der Rinderleber möglich sein, während für die Reinigung der 9.2-Phosphatase das von uns verwendete Verfahren wegen zu geringer Ausbeuten nicht geeignet ist.

Über die quantitative Verteilung von saurer und alkalischer Phosphatase sind in der Literatur sehr widersprechende Angaben zu finden. Eine Ursache dafür könnte die bisher unberücksichtigte Anwesenheit der zweiten alkalischen Phosphatase sein, da die Aktivität der einzelnen Zellorganellen nicht im tatsächlichen pH-Wirkungsoptimum, sondern bei einem willkürlichen pH-Wert gemessen worden ist.

Für die quantitative Bestimmung der einzelnen Phosphatasen an den verschiedenen Zellbestandteilen sollte die Wirkung der anderen isodynamen Phosphatasen möglichst ausgeschaltet sein, da sonst die Aktivitäten der einzelnen Phosphatasen sich überlagern und dadurch ein falsches Bild der quantitativen Verteilung vermittelt wird. Die Aktivität der zu bestimmenden Phosphatase müsste jeweils bei dem aus der Aktivitäts-pH-Kurve ermittelten Wirkungsoptimum gemessen werden.

C. Beschreibung der Versuche

I. Existenz zweier isodynamer alkalischer Phosphatasen in der Rinderleber

1. Auftreten mehrerer pH-Optima im alkalischen Bereich

Bei den bislang untersuchten Enzympräparaten aus Rinderleber haben sich in bezug auf alkalische Phosphatase Aktivitäts-pH-Kurven von glockenförmigem Verlauf und nur einem pH-Spaltungsoptimum ergeben. Die Lage dieses Optimums ist als von der Natur und Konzentration des Substrates sowie der Art des gewählten Puffers abhängig gefunden worden (2, 5, 26).

Dem gegenüber beobachteten erstmals J. RIEHL, E. BAMANN und W. STADELMANN (22) das Auftreten zweier pH-Wirkungsoptima im alkalischen Bereich. Ungeklärt blieb dabei die Ursache für die Ausbildung der beiden pH-Wirkungsoptima.

Wie wir nunmehr finden, nehmen auf die Gestalt der Aktivitäts-pH-Kurve und auf die Anzahl der pH-Wirkungsoptima folgende Faktoren Einfluss:

- a) die Einschaltung einer Butanolbehandlung des Leber-Trockenpräparates,
- b) der Zerkleinerungsgrad der Frischleber,
- c) die Gewinnungsart des Trockenpräparates,
- d) die Natur und Konzentration des bei der Aktivitätsbestimmung verwendeten Puffers.

Für die im folgenden beschriebenen Versuche sind Lösungen alkalischer Phosphatase aus verschiedenen Rinderleber-Trockenpräparaten verwendet worden. Ihre Bereitung erfolgt, indem man 1 Teil Trockenpräparat mit 8 Teilen Wasser unter ständigem Rühren 2 Stunden bei Zimmertemperatur extrahiert. Die Suspension wird mit $n/10$ NaOH auf pH 8.0 eingestellt - dieser pH-Wert ist für die Stabilität der alkalischen Phosphatase der optimale - und nach der Extraktion 10 Minuten bei 2600 g abzentrifugiert. Die überstehende Lösung diente für die Untersuchungen, nachdem zuvor zur Inaktivierung der sauren Phosphatase zu 18 ml des Überstandes 2 ml $m/20$ p-Chlormercuri-benzoesäure zugesetzt und diese Mischung 40 Minuten bei 37°C im Thermostaten schwach geschüttelt worden war.

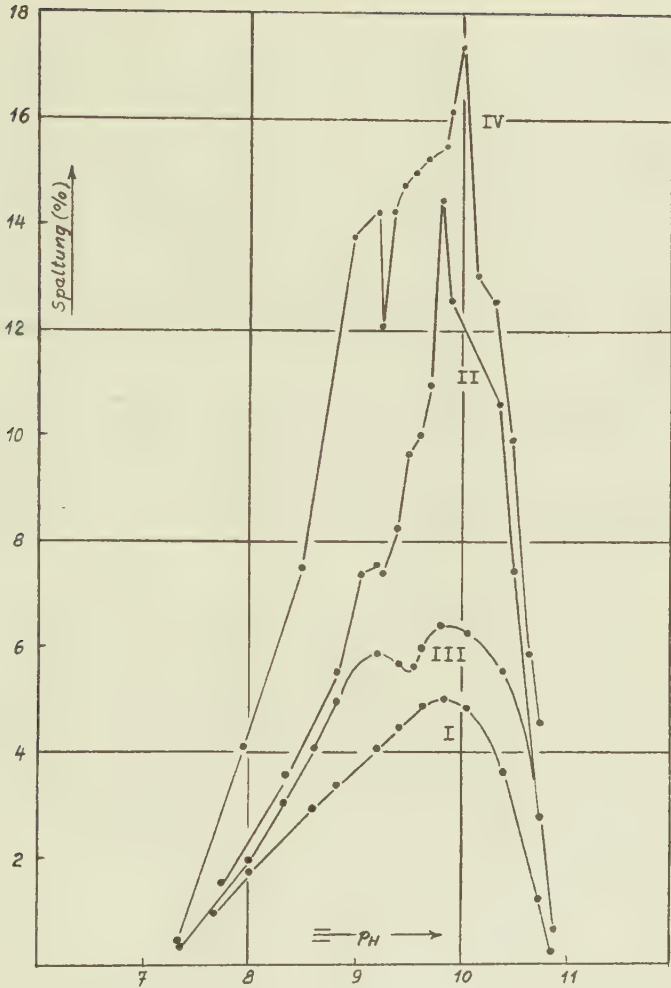


Abbildung 1

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Glycerin- β -phosphorsäure durch alkalische Rinderleberphosphatase in Abhängigkeit von dem Zerkleinerungsgrad der Frischleber, der Gewinnungsart und der Butanolbehandlung des Trockenpräparates

I = Aceton-Trockenpräparat einer im Fleischwolf zerkleinerten Frischleber; 1.48 Ph. E. -[e]_g⁻. II = Gefriergetrocknetes Präparat einer im Ultra-Turrax homogenisierten Frischleber; 2.8 Ph. E. -[e]_g⁻. III = Mit Butanol behandeltes Aceton-Trockenpräparat einer im Fleischwolf zerkleinerten Frischleber; 2.24 Ph. E. -[e]_g⁻. IV = Mit Butanol behandeltes gefriergetrocknetes Präparat einer im Ultra-Turrax homogenisierten Frischleber; 5.52 Ph. E. -[e]_g⁻.

(Die Vers.-Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2m Ester-Lsg.; Rinderleberphosphatase in den oben angegebenen Einheiten; 2 ccm 2.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)

Die in Abbildung 1 dargestellten Ergebnisse lassen die Abhängigkeit des Kurvenverlaufes von den unter a) mit c) aufgeführten Faktoren deutlich erkennen:

Behandelt man die Trockenpräparate, bevor die Enzymlösungen durch Extraktion bereitet werden, nach P. PORTMANN (20) mit n-Butanol, so erhöht sich - wie wir beobachten - die Aktivität der Enzymlösungen und die Aktivitäts-pH-Kurven zeigen darüber hinaus einen anderen Verlauf: Zu dem bisher gefundenen einen Optimum tritt ein zweites, das mehr oder weniger stark ausgeprägt ist. Bei einigen Präparaten war noch ein drittes Spaltungsmaximum festzustellen.

Die Enzymlösung aus einer im Fleischwolf zerkleinerten und acetongetrockneten Leber hat eine glockenförmige Aktivitäts-pH-Kurve mit nur einem Wirkungsoptimum bei pH 9,8, während Lösungen aus demselben aber mit Butanol behandelten Präparat erhöhte Spaltung und zwei Maxima bei pH 9,2 und pH 9,8 zeigen.

Grössere Aktivität - bezogen auf g Trockenpräparat - als die Aceton-Trockenpräparate besitzen die durch Homogenisieren der Frischleber und deren Gefriertrocknung gewonnenen Enzympräparate. Sie weichen ausserdem in ihren Aktivitäts-pH-Kurven von der Glockenform des nicht butanolbehandelten Aceton-Trockenpräparates ab und lassen im Bereich von pH 9,2 ein zweites Maximum erkennen. Dieser mit der Zerkleinerung des Frischpräparates verbundene Aufschluss wirkt sich also ähnlich aus wie eine Butanolbehandlung des Aceton-Trockenpräparates.

Die Beobachtung zweier Umsatzoptima im alkalischen Bereich, die J. RIEHL, E. BAMANN und W. STADELMANN (22) mit Enzymlösungen alkalischer Phosphatase aus Rinderleber-Autolysat gemacht haben, spricht für unsere Auffassung, dass das Auftreten mehrerer pH-Wirkungsmaxima u. a. vom Zerkleinerungsgrad und vom Aufschluss des phosphatase-führenden Gewebes abhängig ist.

Die Butanolbehandlung soll nach der Feststellung von R. K. MORTON (14, 15) eine Lipoprotein-Phosphatase-Bindung sprengen, wodurch zusätzlich Phosphatase in lösliche Form gebracht wird. Es dürfte sich dabei u. E. vor allem um das schwerer lösliche Desmo-Enzym handeln, das nach E. BAMANN und

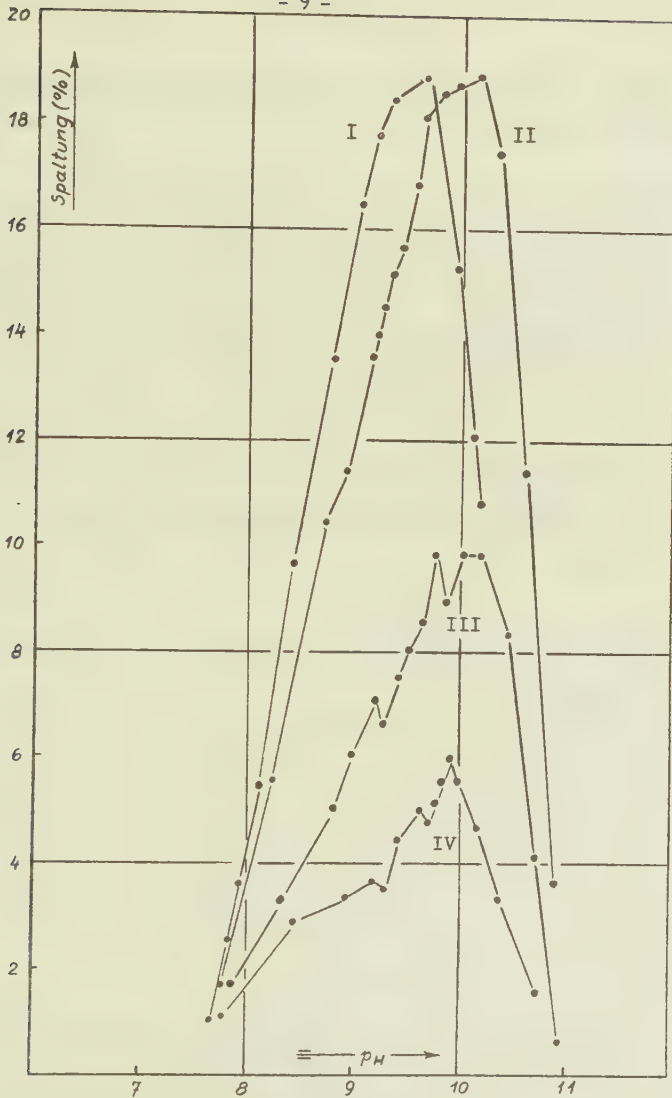


Abbildung 2

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Glycerin- β -phosphorsäure durch alkalische Rinderleberphosphatase aus butanolbehandelten Trockenpräparaten in Abhängigkeit von der Natur und Konzentration des Puffers

I = 0.2m Natriumborat-HCl/NaOH; II = 0.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid;
III = 1.0m Ammoniak/Ammoniumchlorid; IV = 1.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid.

(Die Vers.-Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2m Ester-Lsg.; Rinderleberphosphatase 2.4 Ph.E.-[e]₅; 2 ccm 0.5m Natriumborat-HCl/NaOH-Puffer bzw. 1, 2 oder 3 ccm 2.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)

W. SALZER (3) im Gegensatz zu dem leichter löslichen Lyo-Enzym fester in der Zelle verankert ist.

Eine weitere Voraussetzung für das sichtbare Auftreten mehrerer pH-Spaltungsmaxima ist die Gegenwart von Ammoniak/Ammoniumchlorid in einer Mindestkonzentration entsprechend einer Molarität von 1.0; bei höheren Konzentrationen (Molarität = 1.5) treten ebenfalls mehrere Maxima auf, während bei niedrigeren Konzentrationen (Molarität = 0.5) sich nur ein Spaltungsoptimum abzeichnet (Abb. 2).

2. Mehrere pH-Wirkungsoptima, bedingt durch die Gegenwart zweier isodynamer alkalischer Phosphatasen

Das Auftreten mehrerer pH-Spaltungsmaxima (12, 22) kann folgende Ursachen haben:

- a) Das Phosphatase-Molekül besitzt verschiedene Dissoziationskonstanten.
- b) Das Substrat wird bei den verschiedenen pH-Wirkungsmaxima nach verschiedenen Reaktionsmechanismen gespalten.
- c) Das Phosphatase-Molekül wird durch Schwermetalle in Abhängigkeit vom pH-Wert gehemmt oder aktiviert.
- d) Das Vorhandensein verschiedener Phosphatase-Moleküle erklärt die verschiedenen pH-Wirkungsoptima.

Zu diesen Möglichkeiten ist zu bemerken:

Die Existenz mehrerer Dissoziationskonstanten des Phosphatase-Moleküls scheidet auf Grund der Tatsache aus, dass die alkalische Phosphatase ein Metallprotein ist und nach der Auffassung von J. RIEHL (23) das Substrat über das Metall-Ion bindet.

Nach Untersuchungen von M. COHN (6) mit sauerstoff-markierten Phosphorsäure-Estern werden diese Ester bei der enzymatischen Hydrolyse über den ganzen alkalischen Bereich nach einem einheitlichen Reaktionsmechanismus gespalten.

Die Arbeiten von R.K. MORTON (16) haben gezeigt, dass Verunreinigungen durch Metall-Ionen keinen Einfluss auf die Anzahl der pH-Wirkungsoptima nehmen.

Auf Grund der Untersuchungen der genannten Autoren können die Ursachen a) mit c) für das Auftreten mehrerer pH-Umsatzmaxima ausgeschlossen werden. Es verbleibt damit nur die unter d) aufgeführte Möglichkeit, die die Ausbildung mehrerer Maxima mit dem Vorhandensein mehrerer alkalischer Phosphatasen erklärt. Das bedeutet, dass die alkalische Phosphatase, die bis heute als ein einheitliches Enzym angesehen wird, aus mindestens zwei isodynamen alkalischen Phosphatasen bestehen muss.

3. Charakterisierung der beiden Enzyme in ihren Haupteigenschaften

a) Einfluss des Puffers auf die Aktivität der Enzyme

In Gegenwart von 0.5 m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer erhält man, wie schon erwähnt, Aktivitäts-pH-Kurven mit nur einem pH-Wirkungsoptimum. Genau so ist in Anwesenheit von 0.2 m Natriumborat-Puffer nur ein pH-Optimum zu erkennen. Mit steigender Ammoniak/Ammoniumchlorid-Konzentration (Molarität = 1.0 bzw. 1.5) wird die 9.8-Phosphatase stärker gehemmt als das bei pH 9.2 optimal wirksame Enzym. Auf Grund dessen wird es erst bei höheren Konzentrationen möglich, dass das 9.2-Enzym sich aus dem Kurvenbild abzeichnet und sein eigenes Spaltungsoptimum zeigt. Zusätzlich kann bei pH 9.65 noch ein drittes Maximum auftreten. Ausser auf die Anzahl der pH-Wirkungsoptima hat die Konzentration der Ammonium-Ionen auch Einfluss auf die Grösse des Umsatzes und die Lage der pH-Spaltungsoptima. Mit zunehmender Pufferkonzentration, 0.5 m $\rightarrow$ 1.0 m $\rightarrow$ 1.5 m, nimmt die Spaltung im Verhältnis 3.15 : 1.6 : 1.0 ab und das ursprünglich bei pH 10.15 gefundene Optimum verschiebt sich nach pH 9.85 (Abb. 2).

Ist anstelle von 0.5 m Ammoniak/Ammoniumchlorid 0.2 m Natriumborat-Puffer im Reaktionsgemisch zugegen, so sind die Form der Aktivitäts-pH-Kurve und die Grösse des Umsatzes gleich. Nur in der Lage ihrer pH-Optima unterscheidet sich der Einfluss der Puffer. Das Wirkungsoptimum liegt in Anwesenheit von 0.2 m Natriumborat-Puffer bei pH 9.65 (Abb. 2).

b) Vergleich der Spaltung von Glycerin- α - und Glycerin- β -phosphorsäure durch die beiden Phosphatasen

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Glycerin- β -phosphorsäure weisen die Aktivitäts-pH-Kurven bei Verwendung von Glycerin- α -phosphorsäure als Substrat schon in Anwesenheit von 0,5 m Ammoniak/Ammoniumchlorid zwei Spaltungsmaxima auf.

Glycerin- β -phosphorsäure wird durch die beiden Enzyme rascher gespalten als Glycerin- α -phosphorsäure. Das Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeiten von Glycerin- β -phosphorsäure zu Glycerin- α -phosphorsäure ist von der gewählten Ammoniak/Ammoniumchlorid-Konzentration abhängig: So wird Glycerin- β -phosphorsäure im Verhältnis zu Glycerin- α -phosphorsäure - im Bereich optimaler Spaltung - in Gegenwart von 0,5 m Ammoniak/Ammoniumchlorid 1,5 mal, in Anwesenheit von 1,0 m Puffer 1,7 mal schneller gespalten.

Vergleicht man den Umsatz von Glycerin- α -phosphorsäure bzw. Glycerin- β -phosphorsäure durch die beiden Phosphatasen in Abhängigkeit von der Ammoniak/Ammoniumchlorid-Konzentration, ergibt sich folgendes Bild: Glycerin- α -phosphorsäure wird in Anwesenheit von 0,5 m gegenüber 1,0 m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer 2,2 mal rascher und Glycerin- β -phosphorsäure 1,9 mal schneller umgesetzt (Abb. 3).

c) Das Verhalten der beiden Enzyme gegenüber Magnesium-Ionen

Eine Magnesium-Ionen-Konzentration entsprechend 0,002 molar, erwies sich unter unseren Versuchsbedingungen - 0,04 m Glycerin- β -phosphorsäure; 1,0 m Ammoniak/Ammoniumchlorid - als optimal. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von P. PORTMANN (20) und J. RIEHL (24) zeigen höhere und niedrigere Konzentrationen von Mg-Ionen eine geringer aktivierende Wirkung.

Die Höhe der Aktivierbarkeit der alkalischen Phosphatasen ist abhängig:

- α) von der Konzentration des Puffers,
- β) von der Art des Substrates,
- γ) von der Einfügung einer Butanolbehandlung des Trockenpräparates.

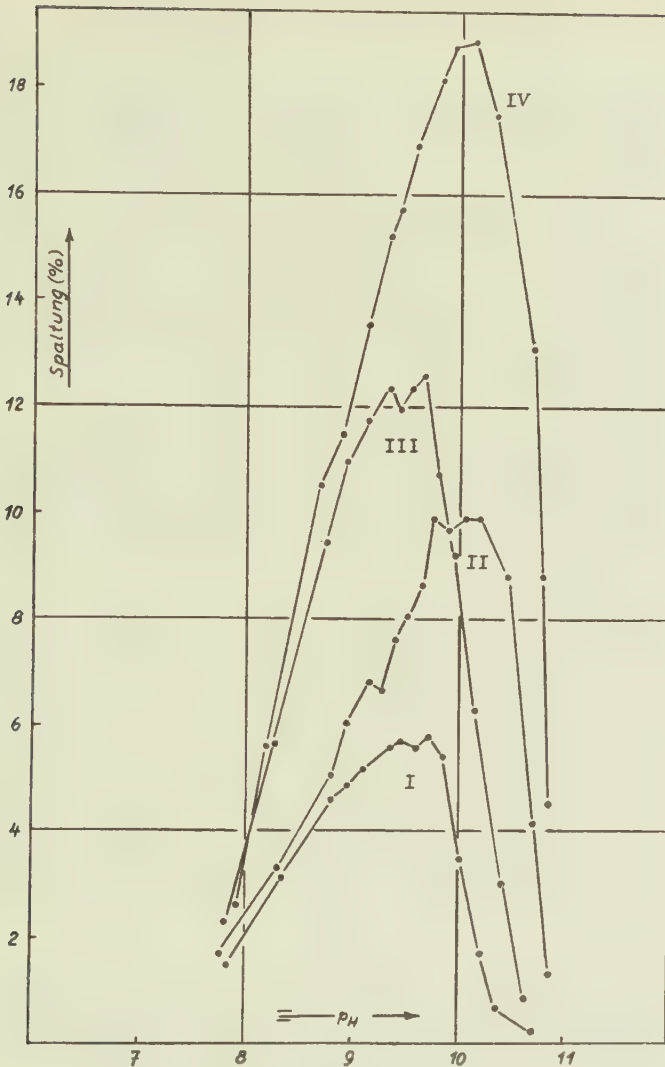


Abbildung 3

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Glycerin- α - bzw. Glycerin- β -phosphorsäure durch alkalische Rinderleberphosphatase aus butanolbehandelten Trockenpräparaten in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration

I = Glycerin- α -phosphorsäure in Gegenwart von 1.0m Ammoniak-Ammoniumchlorid; II = Glycerin- β -phosphorsäure in Gegenwart von 1.0m Ammoniak-Ammoniumchlorid; III = Glycerin- α -phosphorsäure in Gegenwart von 0.5m Ammoniak-Ammoniumchlorid; IV = Glycerin- β -phosphorsäure in Gegenwart von 0.5m Ammoniak-Ammoniumchlorid.

(Die Vers.-Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2m Ester-Lsg.; Rinderleberphosphatase 2.44 Ph.E.-[e] $_{25}^{\circ}$; 1 bzw. 2 ccm 2.5m Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)

Wird Glycerin- β -phosphorsäure durch Enzymlösungen aus butanolvorbehandelten Trockenpräparaten in Gegenwart von 0,002 m Mg-Ionen - diese Metall-Ionen-Konzentration wurde auch bei allen weiteren Versuchen eingehalten - gespalten, so tritt im 1,0 m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Versuchsansatz ab pH 9,25 eine deutliche Aktivierung ein. Sie erreicht im Spaltungsoptimum ca. 25% und steigt im stärker alkalischen Bereich auf ca. 50% an. In Anwesenheit von 0,5 m Puffer wird eine Umsatzsteigerung erst ab pH 9,6 beobachtet, die im Bereich optimaler Spaltung 7% und im absteigenden Ast der Kurve 25% beträgt (Abb. 4).

Die unterschiedliche Aktivierungshöhe ist in der verschiedenen Pufferkonzentration begründet. Es wird die Annahme nahegelegt, dass nicht das Magnesium-Ion sondern das Magnesiumhydroxyd, dessen Konzentration abhängig ist von der Hydroxyl-Ionen-Konzentration, aktivierend wirkt.

Wie schon im Abschnitt "Einfluss des Puffers auf die Aktivität der Enzyme" gezeigt, verringert sich nach Erhöhung des Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffers von 0,5- auf 1,0 molar der Umsatz auf annähernd die Hälfte. Durch Zusatz von Mg-Ionen wird diese Hemmung zwar zu ca. 25% aufgehoben, doch kann diese Umsatzsteigerung nicht als echte Aktivierung bezeichnet werden. Im Gegensatz hierzu ist die in Anwesenheit von 0,5 m Ammoniak/Ammoniumchlorid erhaltene 7proz. Mehrspaltung eine echte Aktivierung, da diese Ammoniak/Ammoniumchlorid-Konzentration die Aktivität der Phosphatasen offensichtlich nicht beeinträchtigt.

Der Einfluss von Mg-Ionen auf die Spaltung von Glycerin- α -phosphorsäure durch Enzymlösungen aus butanolbehandelten Trockenpräparaten ist von der gewählten Pufferkonzentration unabhängig. Sowohl in Gegenwart von 0,5 m als auch von 1,0 m Ammonium-Ionen tritt ab pH 9,25 eine Aktivierung ein, die stetig zunimmt und im Spaltungsoptimum 25 % erreicht (Abb. 5).

Die Aktivitäts-pH-Kurven von Lösungen aus Enzympräparaten, die nicht mit Butanol aufgeschlossen sind, bieten nach Mg-Ionen-Zusatz ein anderes Bild (Abb. 6). In Gegenwart von Glycerin- β -phosphorsäure und 1,0 m Ammoniak/Ammoniumchlorid ist über den gesamten Kurvenbereich konstant eine Mehrspaltung von 1% zu beobachten. Bezogen auf die Spaltungshöhe der nicht mit Mg-Ionen versetzten Enzymlösung bedeutet dies bei pH 8,0 ca. 100%, im Spaltungsoptimum dagegen nur 15% Aktivierung.

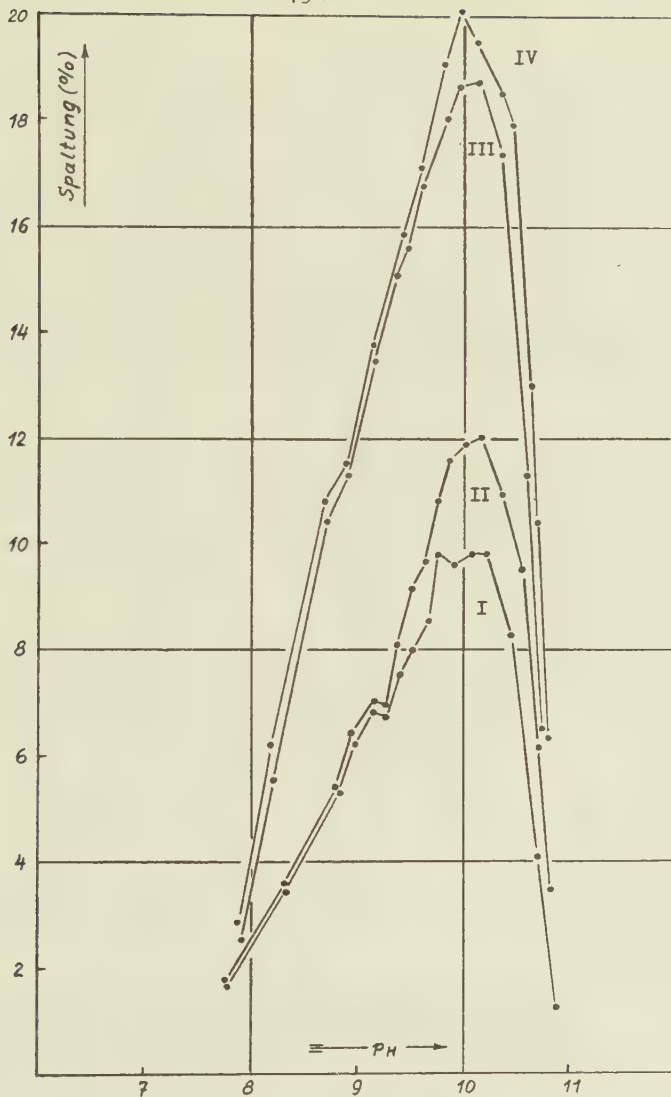


Abbildung 4

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Glycerin- β -phosphorsäure durch alkalische Rinderleberphosphatase aus butanolbehandelten Trockenpräparaten in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration und der Gegenwart von Magnesium-Ionen

I = 1.0m Ammoniak/Ammoniumchlorid ohne Mg^{++} ; II = 1.0m Ammoniak/Ammoniumchlorid mit Mg^{++} ; III = 0.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid ohne Mg^{++} ; IV = 0.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid mit Mg^{++} .
(Die Vers.-Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2m Ester-Lsg.; Rinderleberphosphatase 2.60 Ph.E.-[e]₉; 1 bzw. 2 ccm 2.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe; 1 ccm 0.01m $MgCl_2$ -Lsg.).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)

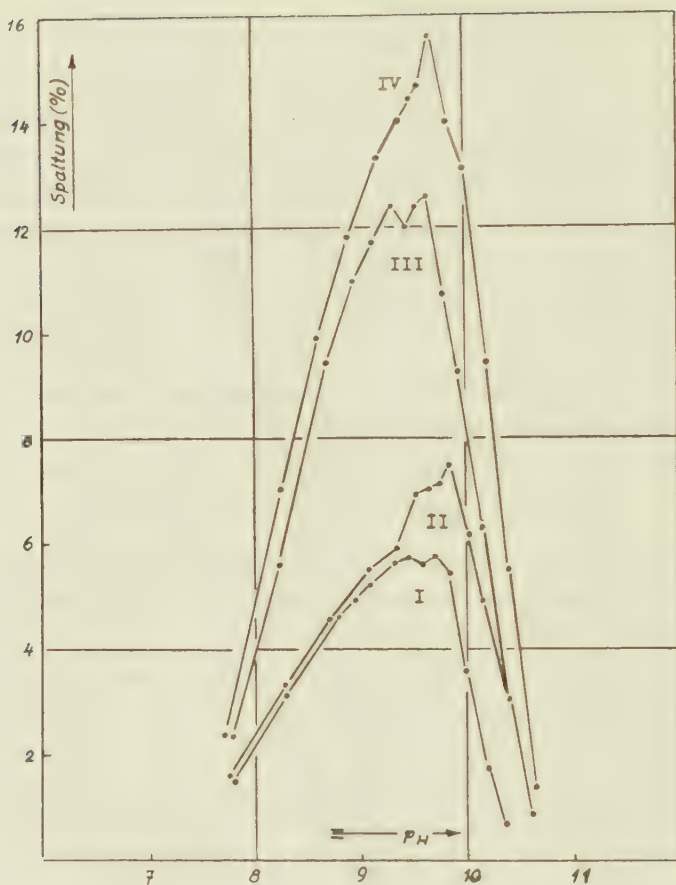


Abbildung 5

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Glycerin- α -phosphorsäure durch alkalische Rinderleberphosphatase aus butanolbehandelten Trockenpräparaten in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration und der Gegenwart von Magnesium-Ionen

I = 1.0 Ammoniak/Ammoniumchlorid ohne Mg^{++} ; II = 1.0m Ammoniak/Ammoniumchlorid mit Mg^{++} ; III = 0.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid ohne Mg^{++} ; IV = 0.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid mit Mg^{++} .
(Die Vers.-Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2m Ester-Lsg.; Rinderleberphosphatase 2.60 Ph.E. [e]₉; 1 bzw. 2 ccm 2.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe; 1 ccm 0.01m $MgCl_2$ -Lsg.).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)

Im Falle der Spaltung von Glycerin- α -phosphorsäure durch Enzymlösungen aus nicht butanolbehandelten Präparaten ist die Aktivitäts-pH-Kurve derjenigen ähnlich, die unter sonst gleichen Bedingungen aber mit Glycerin- β -phosphorsäure erhalten wird. Gleichzeitig lässt der Verlauf der Kurve erkennen, dass aus dem nicht butanolbehandelten Enzympräparat weniger 9,2-Phosphatase bei der Extraktion in Lösung getreten ist. Dies zeigt sich nach Mg-Ionen-Zusatz in der unterschiedlichen Aktivierbarkeit und bei Verwendung von Glycerin- α -phosphorsäure in der Gestalt der Aktivitäts-pH-Kurve (Abb. 6).

Unsere Annahme, dass die bisher als einheitliches Enzym angesehene alkalische Phosphatase aus zwei verschiedenen Enzym-Individuen besteht, kann durch die Untersuchungen der Mg-Aktivierung und des Verhaltens der beiden Substrate als bestätigt gelten. Die in Abhängigkeit von Puffer und Substrat nach Magnesium-Ionen-Zusatz ab pH 9,25 bzw. pH 9,6 deutlich auftretende Aktivierung dient dafür als sicherer Beweis. Offensichtlich wird die 9,8-Phosphatase einerseits durch Ammonium-Ionen mehr gehemmt, andererseits im Gegensatz zu dem 9,2-Enzym durch Mg-Ionen aktiviert.

Die Existenz der beiden Enzyme findet in den Aktivitäts-pH-Kurven unserer Versuchsbedingungen in Form von zwei oder drei Spaltungsmaxima ihren Ausdruck. Das dritte Spaltungsmaximum schreiben wir nicht der Existenz einer weiteren alkalischen Phosphatase zu. Vielmehr erklären wir diese Erscheinung damit, dass sich unter gewissen uns bisher nicht bekannten Bedingungen der absteigende Kurventeil der 9,2-Phosphatase mit dem aufsteigenden Ast der 9,8-Phosphatase zu einem dritten Maximum addiert.

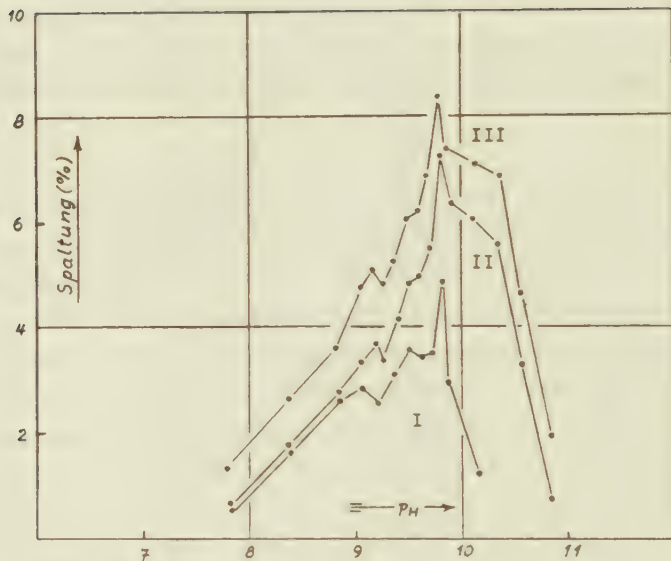


Abbildung 6

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Glycerin- α - bzw. Glycerin- β -phosphorsäure durch alkalische Rinderleberphosphatase aus nicht butanolbehandelten Präparaten

I = Glycerin- α -phosphorsäure; II = Glycerin- β -phosphorsäure; III = Glycerin- β -phosphorsäure mit Mg^{++} .

(Die Vers. - Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2m Ester-Lsg.; Rinderleberphosphatase 1.24 Ph.E.-[e]₉; 2 ccm 2.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe; 1 ccm 0.01m $MgCl_2$ -Lsg.).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)

II. Lokalisation der beiden alkalischen Phosphatasen in der Rinderleber

1. Die Verteilung der isodynamen Phosphatasen innerhalb der Zelle im Lichte der bisherigen Untersuchungen

Die bisher über die intrazelluläre Verteilung von isodynamen Phosphatasen veröffentlichten Ergebnisse vermitteln noch nicht den erwünschten Aufschluss; sie sind zum Teil sogar widerspruchsvoll.

Was die Lokalisation der alkalischen Phosphatase in Rinderleber betrifft, so weiss man darüber bis heute noch gar nichts. Über die Verteilung der alkalischen Phosphatase in Froschleber, Rattenleber und menschlicher Placenta liegen zwar Untersuchungen vor, doch geben diese kein übereinstimmendes Bild.

So fand L. J. JOURNEY (11) für Froschleber die Verteilung in Abhängigkeit von dem für die Homogenatbereitung gewählten Medium. In Nicht-Elektrolyten, wie Zuckerlösung, besaßen die Mikrosomen und Zellkerne die grösste Aktivität, während in Salzlösungen die Mitochondrien-Fraktion fast die ganze Aktivität trägt. Nach den Untersuchungen von A. B. NOVIKOFF, E. PODBER und J. RYAN (18) an Rattenleber ist die quantitative Aussage bestimmt durch die Natur des zur Aktivitätsbestimmung verwendeten Substrates: In Anwesenheit von Adenosin-5-phosphat, gemessen bei pH 7.4, zeigen die Zellkerne 40-45%, die Mitochondrien 40-45% und die submikroskopischen Teilchen 5-10% der Ausgangsaktivität. Im Gegensatz dazu führen bei Verwendung von Adenosin-triphosphat die Zellkerne 10-20% die Mitochondrien 70-75% und die submikroskopischen Teilchen 2-4% Aktivität. Für menschliche Placenta geben G. STARK und W. JUNG (29) folgende Verteilung an: 2.2% in den Zellkernen, 7% in den Mitochondrien und 92.6% in Mikrosomen + Überstand.

Wenn auch bei den untersuchten Organen inbezug auf die Verteilung der alkalischen Phosphatase für das gleiche Organ gewisse individuelle Unterschiede zu erwarten sind, so doch nicht in dem Ausmasse, wie es die dargelegten Beobachtungen von L. J. JOURNEY sowie A. B. NOVIKOFF und Mitarbeitern

zeigen. Der Grund dafür liegt u. E. in der angewandten Versuchsmethodik. Während Versuche, die in Zuckerlösung durchgeführt werden, weitgehend die Verhältnisse in der Zelle widerspiegeln, dürfte dies bei Anwendung von Elektrolyt-Lösungen nicht der Fall sein. In Salzlösungen erfahren die Zellkerne Osmolyse. Die so freigewordene Phosphatase wird besonders von den Mitochondrien adsorbiert. Hierdurch ist zu erklären, warum in einem Falle die Mikrosomen und Zellkerne, im anderen Falle vor allem die Mitochondrien hohe phosphatatische Aktivität aufweisen. Adenosin-triphosphat erscheint uns für die Bestimmung der Aktivität von alkalischer Mono-Phosphatase ungeeignet, da dieses Substrat ein Pyrophosphorsäure-Ester ist und deshalb nur von einer spezifischen Pyrophospho-Esterase gespalten werden kann.

Wesentlich genauer ist man über die Verteilung der sauren Phosphatase innerhalb der Zelle unterrichtet. Die Arbeiten hierüber von G. E. PALADE (19), R. GIANETTO und R. VIALA (8) sowie von C. DE DUVE und Mitarbeitern (7) vermitteln ein einheitliches Bild: Danach ist die saure Phosphatase hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert. Darüber hinaus wird saure Phosphatase auch noch von weiteren Zellpartikeln geführt, die in ihrer Masse zwischen derjenigen der Mitochondrien und derjenigen der Mikrosomen liegen.

2. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen

a) Verteilung der beiden alkalischen Phosphatasen aus Rinderleber auf die Fraktionen der Zellbestandteile

Wie wir bei der enzymatischen Ausmessung der einzelnen Fraktionen finden, ist die Hauptmenge der beiden alkalischen Phosphatasen - bezogen auf Gramm Trockenpräparat - in den Zellkernen und in den Mikrosomen verankert (Abb. 7). Die Mitochondrien dagegen besitzen nur sehr geringe Aktivität. Wir führen diese Aktivität auf Verunreinigungen durch Mikrosomen und Adsorption von Lyo-Phosphatase zurück, die bei Beschädigung der Zellkern-Membran in die Zuckerlösung getreten ist. Die Aktivität der Cytoplasma-Fraktion dürfte ebenfalls durch in Lösung befindliche Phosphatase und solche phosphatase-

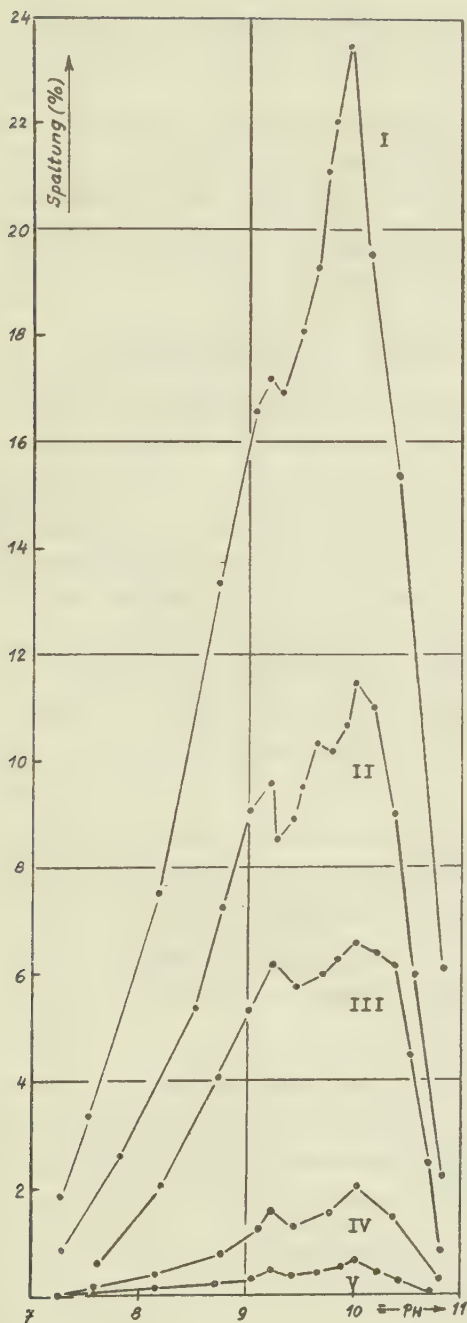


Abbildung 7

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Glycerin- β -phosphorsäure durch alkalische Rinderleberphosphatase aus butanolbehandelten Trockenpräparaten

- I = Zellkern-Fraktion 6.4 Ph.E. -[e]₉⁻
 II = Homogenat 3.6 Ph.E. -[e]₉⁻
 III = Mikrosomen-Fraktion 2.12 Ph.E. -[e]₉⁻;
 IV = Cytoplasma-Fraktion 0.4 Ph.E. -[e]₉⁻;
 V = Mitochondrien-Fraktion 0.1 Ph.E. -[e]₉⁻.

(Die Vers.-Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2m Ester-Lsg.; Rinderleberphosphatase in den oben angegebenen Phosphatase-Einheiten; 2 ccm 2.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)

führende Teilchen verursacht sein, die bei der angewandten Zentrifugierdauer nicht niedergeschlagen werden konnten.

Die gemessenen Aktivitäten der Zell-Fraktionen können trotz gleicher Gewinnung nicht ohne Einschränkungen miteinander verglichen werden, da eine mögliche Inaktivierung während der Auftrennung des Homogenates sowohl von der Zeit als auch von der Häufigkeit mechanischer Einwirkungen, wie Resuspendieren und Zentrifugieren, abhängig ist.

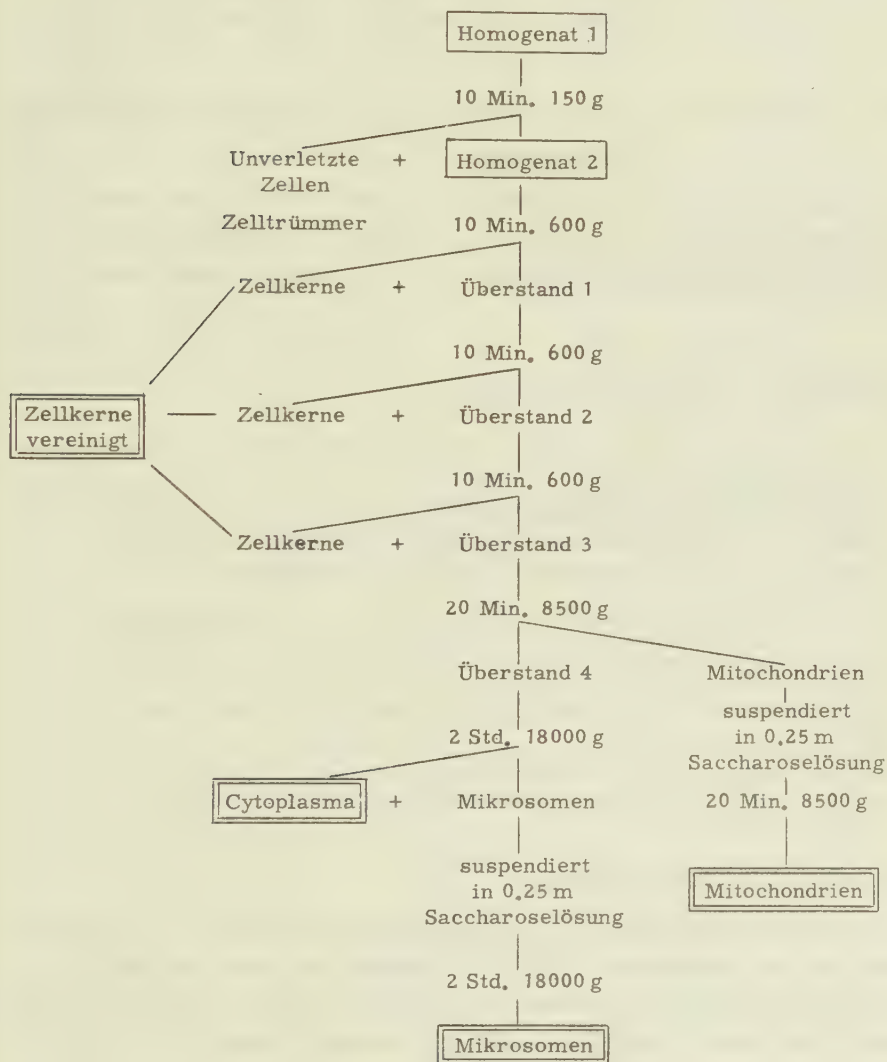
b) Verfahren zur Auftrennung des Homogenates in die Zellbestandteile

Die schlachtfrische Rinderleber wird - in kleine Stücke geschnitten - durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm gepresst und mit 5 Teilen eiskalter 0,25 m Rohrzuckerlösung in einem Glasgerät nach POTTER und ELVEHJEM (21) homogenisiert. Das Homogenat 1 filtriert man zur Entfernung der restlichen Bindegewebsteilchen durch einen Perlonstrumpf und zentrifugiert es zur Abtrennung unverletzter Leberzellen und Zelltrümmer 10 Minuten bei 150 g in einer gekühlten Zentrifuge (International refrigerated centrifuge, Pr I). Das so erhaltene Leberhomogenat wird in Anlehnung an die Methode von G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER und G. E. PALADE (10) durch fraktioniertes Zentrifugieren in die einzelnen Zellbestandteile aufgetrennt. (Fraktionierungs-Schema).

Das Homogenat 2 wird zur Gewinnung von Zellkernen 3 x 10 Minuten bei 600 g zentrifugiert, die dabei anfallenden drei Zellkernsedimente werden vereinigt und zweimal gewaschen, indem man das vereinigte Sediment in 0,25 m Rohrzuckerlösung im "Potter" suspendiert und die Suspension bei 600 g und +2°C zentrifugiert. Das dabei erhaltene Sediment besteht aus gereinigten Zellkernen.

Der von Zellkernen befreite Überstand 3 wird 20 Minuten bei 8500 g und +2°C in der Spinco-Zentrifuge (Modell L) zentrifugiert. Die niedergeschlagenen Mitochondrien suspendiert man in 0,25 m Saccharoselösung. Nach erneutem 20minütigem Zentrifugieren der Suspension liefert das entstehende Sediment die Mitochondrien-Fraktion.

Schema zur Fraktionierung der Zellbestandteile von Rinderleber



Die mit der Auftrennung des Homogenates verbundenen Arbeiten wurden alle bei Temperaturen von 0-3°C durchgeführt.

Zur Gewinnung der Mikrosomen wird der Überstand 4 in der Spinco-Zentrifuge 2 Stunden bei 18000 g und +2°C zentrifugiert. Man suspendiert das Sediment in eiskalter 0,25 m Rohrzuckerlösung und schlägt aus dieser Suspension durch zweistündiges Zentrifugieren bei 18000 g die gereinigten Mikrosomen nieder.

Der von den Mikrosomen befreite Überstand stellt die Fraktion des Cytoplasmas dar.

Die einzelnen Fraktionen der Zellbestandteile haben wir im Lyophilisator (Fabrikat Weinkauf) gefriergetrocknet oder in Aceton-Trockenpräparate übergeführt, aus denen dann, wie schon beschrieben, die Enzymlösungen bereitet werden ²⁾

c) Darstellung von 9.8- bzw. 9.2-Phosphatase

Die erkannte Verteilung der alkalischen Phosphatasen legt die Frage nahe, ob mit der Auftrennung des Leberhomogenates gleichzeitig eine Trennung der beiden alkalischen Phosphatasen möglich ist.

Wie Abbildung 7 zeigt, lässt die Zellkern-Fraktion gegenüber dem Homogenat zwar deutliche Anreicherung der 9.8-Phosphatase erkennen, doch besitzt die Zellkern-Fraktion noch immer Anteile an 9.2-Phosphatase. Dies folgt aus dem zweiten Spaltungsoptimum bei pH 9.2. Der Grund hierfür kann entweder Verunreinigung der Zellkerne durch intakte Leberzellen oder die Lokalisation von 9.2-Phosphatase in den Zellkernen sein.

Auch in der Mikrosomen-Fraktion liegen noch beide Enzyme vor, was durch zwei annähernd gleich grosse Maxima der Aktivitäts-pH-Kurve bei pH 9.2 bzw. pH 10.0 ersichtlich ist. Als Ursache kommen auch in diesem Falle zwei Möglichkeiten in Frage. Entweder sind beide Enzyme in den Mikrosomen verankert oder beim Homogenisieren und Suspendieren sind 9.8-Phosphatase tragende Zellkern-Bruchstücke von solcher Masse angefallen, dass sie zusammen mit den Mikrosomen abzentrifugiert werden.

Um diese aufgezeigten Probleme zu lösen, versuchten wir unter Vernachlässigung der Mitochondrien- und Cytoplasma-Fractionen, in denen keine Lokalisation von alkalischer Phosphatase festgestellt wurde, die Zellkerne noch reiner darzustellen und aus der Mikrosomen-Fraktion die 9.2-Phosphatase zu isolieren.

α) 9.8-Phosphatase aus Zellkernen

Zur Darstellung von Zellkernen, frei von intakten Leberzellen, wird das Homogenat, wie wir es nach oben beschriebener Methode erhalten, über eiskalte 0.35 m Rohrzuckerlösung geschichtet und 10 Minuten bei 200 g und +2°C zentrifugiert. Man saugt die obere Phase von der unteren vorsichtig ab, schichtet

²⁾Auf die enzymatische Ausmessung der Waschflüssigkeiten haben wir verzichtet, da uns vorerst nur die qualitative Verteilung der alkalischen Phosphatasen interessierte.

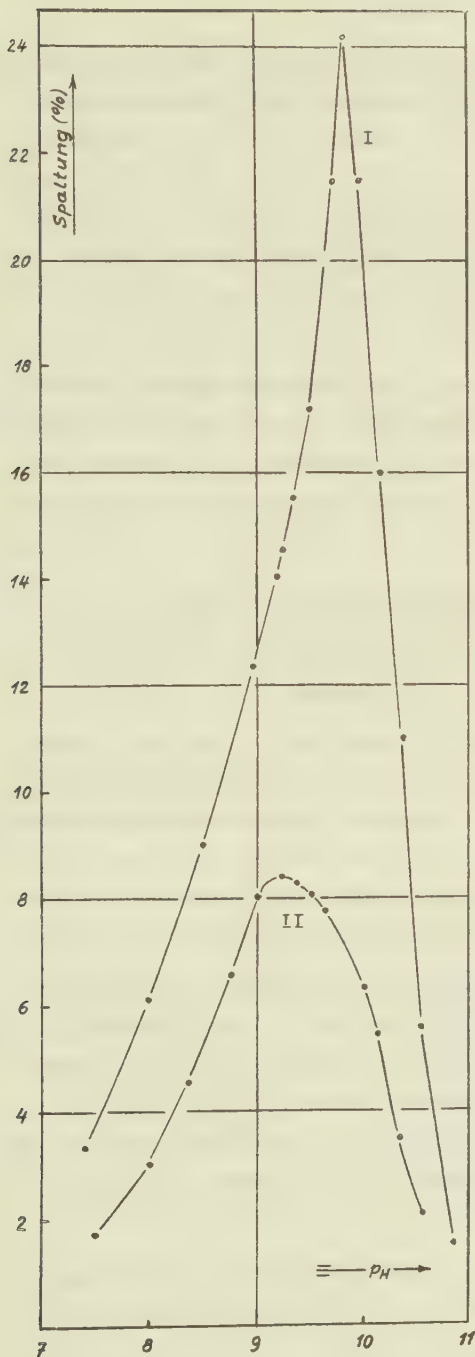


Abbildung 8

Wirkung der getrennten isodynamen alkalischen Phosphatasen aus Rinderleber auf Glycerin- β -phosphorsäure; Wirkungsoptima bei pH 9.8 bzw. 9.2.

- I = Gereinigte Zellkern-Fraktion
4.96 Ph.E.-[e]₅; Wirkungsoptimum pH 9.8.
II = Isolierte 9.2-Phosphatase aus der Mikrosomen-Fraktion 3.2 Ph.E.-[e]₅.

(Die Vers.-Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2m Ester-Lsg.; Rinderleberphosphatase in den oben angegebenen Phosphatase-Einheiten; 2 ccm 2.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)

die abgesaugte obere Phase über 0,35 m Saccharoselösung und zentrifugiert nochmals 10 Minuten bei 200 g. Nach Trennung der beiden Phasen verwirft man die untere und zentrifugiert die überstehende Lösung 3 x 10 Minuten bei 700 g. Die drei Sedimente werden vereinigt, in eiskalter 0,25 m Zuckerlösung suspendiert und erneut bei 700 g niedergeschlagen. Aus diesem Sediment bereitet man nach der Gefriertrocknung die Enzymlösung. Die Aktivitäts-pH-Kurve der so erhaltenen Enzymlösung hat nur ein Spaltungsoptimum bei pH 9,8 (Abb. 8).

Wir folgern aus diesem Ergebnis, dass in den Zellkernen nur die 9,8-Phosphatase lokalisiert ist und dass das zweite Spaltungsmaximum bei pH 9,2, wie wir es in den nach der unter II, 2b) beschriebenen Methode gewonnenen Zellkern-Präparaten fanden, offenbar auf noch vorhandene intakte Leberzellen und Zelltrümmer zurückzuführen ist.

β) Isolierung der 9,2-Phosphatase aus der Mikrosomen-Fraktion

Es wurde versucht von den zwei in der Mikrosomen-Fraktion vorhandenen alkalischen Phosphatasen das 9,2-Enzym zu isolieren.

Wir gingen dabei von der Überlegung aus, dass eine Trennung der 9,2-Phosphatase führenden Partikel von den 9,8-Enzym tragenden Teilchen möglich sein müsste, wenn sich die beim Homogenisieren entstandenen Zellkern-Fragmente in ihrer Grösse von den Mikrosomen unterscheiden, oder wenn die 9,2-Phosphatase mit den grösseren Teilchen der Mikrosomen-Fraktion und die 9,8-Phosphatase mit den kleineren Teilchen verbunden ist.

Zum Zwecke dieser Trennung werden die nach dem Fraktionierungs-Schema erhaltenen Mikrosomen in dem 5-10fachen Volumen eiskalten Wassers suspendiert und sofort mit Aceton von -10°C versetzt. Sobald die erste Ausflockung auftritt, saugen wir diese in einer Porzellan-Nutsche ab. Das Filtrat wird verworfen, der Rückstand erneut in tiefgekühltem Aceton aufgeschwemmt und aus dieser Suspension abgenutscht. Danach erfolgt Trocknung des acetonfeuchten Rückstandes an der Luft.

Die aus dem Aceton-Trockenpräparat bereitete Enzymlösung wurde ausgemessen, wobei die Aktivitäts-pH-Kurve nur noch ein Spaltungsoptimum bei

pH 9.2 zeigte (Abb. 8). Damit war es gelungen, auch die 9.2-Phosphatase zu isolieren und somit präparativ die Existenz der beiden alkalischen Phosphatasen zu beweisen.

Die Tatsache, dass in Zellkernen und Mikrosomen, nicht aber in Mitochondrien alkalische Phosphatase lokalisiert ist, und die Möglichkeit die 9.2-Phosphatase aus der Mikrosomen-Fraktion unter Anwendung von Aceton zu isolieren, veranlassten uns zu dem Versuch, den Überstand 3, aus dem die Zellkerne abgetrennt waren, ebenfalls mit Aceton anzufällen und so die 9.2-Phosphatase darzustellen. Auf diese Weise wäre die zeitraubende, aktivitäts- und ausbeutemindernde Gewinnung der Mikrosomen-Fraktion durch differenziertes Zentrifugieren zu umgehen.

In einem Falle war die Isolierung des 9.2-Enzyms mit dieser vereinfachten Methode möglich. Die erste Ausflockung nach Aceton-Zusatz erwies sich jedoch infolge der Anwesenheit der Mitochondrien als ein weniger zuverlässiges Signal zum Absaugen als bei der Mikrosomen-Fraktion, und die Ergebnisse waren dementsprechend schlecht reproduzierbar.

III. Versuche zur Trennung der beiden isodynamen alkalischen Phosphatasen durch fraktioniertes Fällern mit Ammoniumsulfat

Die unterschiedliche Lokalisation der beiden isodynamen alkalischen Phosphatasen ermöglicht ihre Trennung durch fraktioniertes Zentrifugieren. Während die 9.8-Phosphatase über die gefriergetrocknete Fraktion der Zellkerne in guter Ausbeute zu erhalten ist, hohe Aktivität besitzt und sich verhältnismässig rasch darstellen lässt, ist dagegen die Gewinnung der 9.2-Phosphatase aus der Mikrosomen-Fraktion weit schwieriger und vor allem mit einem sehr grossen Zeitaufwand verbunden. Hinzu kommt, dass die Menge des als Aceton-Trockenpräparat gewonnenen 9.2-Enzyms sehr klein und auf Grund der oft wiederholten mechanischen Einwirkungen sowie der Aceton-Fällung von geringer Aktivität ist.

Für die Gewinnung grosserer Mengen 9.2-Enzyms, wie sie für die Anreicherung und für kinetische Messungen nötig sind, dürfte diese Methode deshalb ausscheiden.

Wir versuchten daher, die Trennung der beiden alkalischen Phosphatasen durch fraktioniertes Fällern der Proteine mit Ammoniumsulfat zu erreichen:

Als Enzympräparat dient ein Trockenpräparat, das aus schlachtfrischer Rinderleber mit 0,25 m Rohrzuckerlösung im Ultra-Turrax und anschliessender Gefrier Trocknung gewonnen ist. Von diesem Präparat werden nach erfolgter Butanolbehandlung 100 g 3mal mit Wasser (400ml, 200ml, 200ml) jeweils 2 Stunden bei Zimmertemperatur und unter stetem Rühren extrahiert. Die Lösung stellen wir mit n/10 NaOH auf pH 8,0 ein. Nach jeder Extraktion wird 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und der abzentrifugierte Rückstand erneut ausgezogen. Die drei vereinigten Lösungen verwenden wir für die fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat, wobei die für den gewünschten Sättigungsgrad nötige Ammoniumsulfat-Menge nach folgender Formel (17) berechnet wird:

$$X_0 = \frac{51.472 (s_2 - s_1)}{1 - 0.271 s_2}$$

X_0 : g Ammoniumsulfat, die zu 100 ml Lösung der Sättigung s_1 bei 0°C gegeben werden müssen, um Sättigung s_2 zu bekommen.

Durchführung der Fällung

Die zu sättigende Enzymlösung wird in einem Solebad (Eis/Kochsalz) im Verlauf von 2-3 Stunden mit der nach obiger Formel errechneten Menge von Ammoniumsulfat, reinst (Merck) gleichmässig und unter Rühren auf die gewünschte Sättigungsstufe gebracht³⁾. Ist alles Ammoniumsulfat zugegeben, lässt man zur Einstellung des Gleichgewichtes noch 1-2 Stunden weiterrühren und stellt die Lösung dann ca. 1 Stunde in den Kühlschrank bei 0°C. Danach wird 10 Minuten bei 10000 g und 0°C zentrifugiert.

Die überstehende Lösung dient für die weitere Ammoniumsulfat-Sättigung, während das niedergeschlagene Protein in wenig eiskalter 0,1 m Natriumacetat-Lösung suspendiert und die Suspension zur Entfernung der Ammonium-Ionen gegen fliessendes Leitungswasser dialysiert wird, bis das Dialyse-Wasser mit Nessler's-Reagens keine Reaktion mehr zeigt. Nach beendeter Dialyse wird die Enzymlösung mit n/100 NaOH auf pH 8,0 eingestellt und nach Bestimmung des Volumens ausgemessen. Die weiteren Sättigungsschritte erfolgen auf die gleiche Weise. Der nach dem Zentrifugieren der total gesättigten Lösung erhaltene Überstand wird zur Ermittlung der in Lösung verbliebenen Restaktivität ebenfalls dialysiert und ausgemessen.

Von der im Ammoniumsulfat-Sättigungs-Versuch eingesetzten Gesamtaktivität - die Berechnung erfolgt aus: abgespaltene γ P im pH-Optimum pro ml Enzymlösung multipliziert mit der Anzahl ml der verwendeten Enzymlösung - werden 80% wiedergefunden, die sich auf die einzelnen Sättigungsstufen, wie in Tabelle 1 gezeigt, verteilen. Man sieht, dass mehr als 90% der wiedergefundenen Enzym-Aktivität in den Fraktionen zwischen 40% und 75% Sättigung anfällt.

Die Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der einzelnen Sättigungsstufen zeigen (Abb. 9), dass durch fraktionierte Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat eine Trennung und Isolierung der 9,2-Phosphatase nicht möglich ist. Die Kurven sind sich alle sehr ähnlich, zumal wenn man die unterschiedlichen Spaltungsgrössen berücksichtigt, und weisen durchwegs mehrere pH-Spaltungsmaxima auf.

³⁾ Ein rasches, ungleichmässiges Zufügen des Ammoniumsulfates ist zu vermeiden, da durch örtlich hohe Salzkonzentrationen unerwünschte Proteine ausfallen, die nur sehr langsam wieder in Lösung gehen.

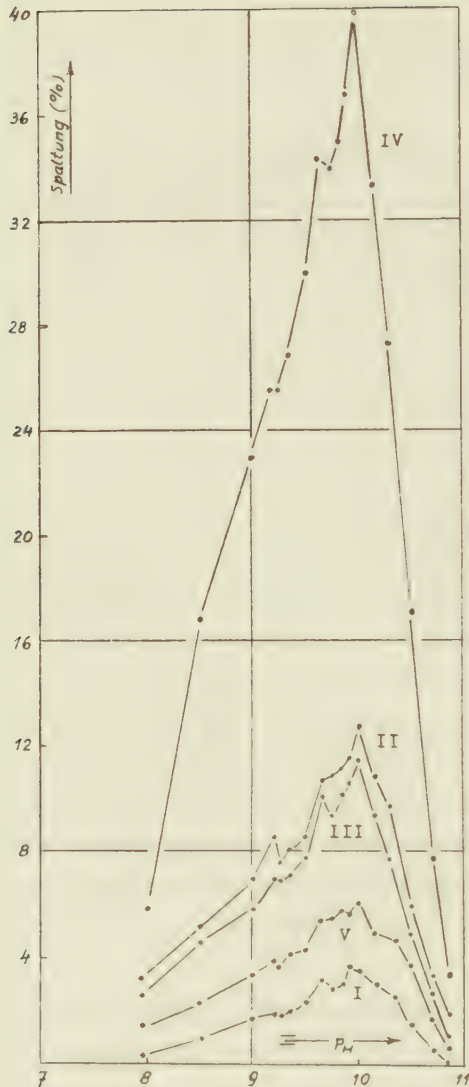


Abbildung 9

Aktivitäts-pH-Kurven verschiedener Phosphatase-Fractionen, erhalten durch steigende Sättigung der Enzymlösung mit Ammoniumsulfat

(Enzymlösung gewonnen aus butanolbehandeltem Rinderleber-Trockenpräparat; Substrat = Glycerin- β -phosphorsäure).

- I = Sättigung 0.2-0.4, 0.72 Ph. E. - $[e]_g^-$
- II = Sättigung 0.4-0.5, 2.8 Ph. E. - $[e]_g^-$
- III = Sättigung 0.5-0.6, 2.32 Ph. E. - $[e]_g^-$
- IV = Sättigung 0.6-0.7, 9.2 Ph. E. - $[e]_g^-$
- V = Ausgangslösung 1.28 Ph. E. - $[e]_g^-$.

(Die Vers. - Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2m Ester-Lsg.; Rinderleberphosphatase in den oben angegebenen Phosphatase-Einheiten; 2 ccm 2.5m Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)



Abbildung 10

Wirkung der Fraktion der Ammoniumsulfatsättigung 0.7-0.75
auf Glycerin- β -phosphorsäure

(Die Vers.-Ans. enth. in 5 ccm: 1 ccm 0.2 m Ester-Lsg.;
Rinderleberphosphatase 2.2 Ph. E. $-(e)_9^-$; 2 ccm 2.5 m
Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen
pH-Stufe).

(Reaktionsdauer = 1 Std.; Reaktionstemperatur = 37°C)

Tabelle 1

Verteilung der alkalischen Phosphatase auf die einzelnen Fraktionen
der Ammoniumsulfat-Fällung

Sättigungsstufe	Zugesetztes Ammoniumsulfat in g/100 ml	Prozentualer Anteil der Gesamtaktivität
0.0 -0.2	10.86	0.6
0.2 -0.4	11.54	4.5
0.4 -0.5	5.95	15.7
0.5 -0.6	6.15	14.3
0.6 -0.7	6.35	50.3
0.7 -0.75	3.24	14.5
0.75-1.0	17.65	0
Überstand	0	0

Eine Ausnahme bildet nur die Kurve für die Sättigung 0.7-0.75. Aus ihrem Verlauf sowie aus der Lage des pH-Wirkungsoptimums geht deutlich hervor, dass hier nur die 9.8-Phosphatase vorliegt (Abb. 10).

IV. Zur Methodik

1. Substrate:

Glycerin- α -phosphorsäure als $\text{CaC}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

(246.2) E. Merck, Darmstadt, List, Nr. 4111.

Glycerin- β -phosphorsäure als $\text{Na}_2\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

(306.2) Farbenfabriken Bayer, Leverkusen.

2. Bereitung der Aceton-Trockenpräparate:

1 Teil Rinderleber, im Fleischwolf zerkleinert, wird unter kräftigem Rühren in 3 Teile Aceton von 0°C gegeben und danach sofort auf einer Porzellan-Nutsche abgesaugt. Man wiederholt den Vorgang ohne Verzögerung noch zweimal, beim dritten Mal wird anstelle von Aceton eiskalter Äther zur Entfettung des Leber-Präparates verwendet. Das ätherfeuchte Präparat lässt man anschliessend auf Filtrierpapier ausgebreitet an der Luft trocknen.

3. Butanol-Behandlung der Trockenpräparate:

Die Trockenpräparate werden mit der 10fachen Menge n-Butanol p.A. im Homogenisator (Fabrikat Bühler) 2 Minuten unter Kühlung bei Tourenzahl 14 homogenisiert; dann saugt man auf einer Porzellan-Nutsche trocken.

4. Der Versuchsansatz:

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist jeweils bei den einzelnen Abbildungen angegeben. Die Reaktionsgemische wurden in Reagenzgläsern unter leichtem Schütteln im Thermostaten bei 37°C gehalten. Die nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten entnommenen Analysenproben betrugen 2 bzw. 1 ml, je nach der Menge freigesetzten Phosphats. Die Reaktion wurde durch Zugabe der gleichen Menge 25proz. Trichloressigsäure abgestoppt.

5. pH-Messung in den Versuchsansätzen:

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte nach Abkühlen einer Probe der Versuchsansätze bei 20°C mit einem pH-Meter der Fa. L. Pusl, München, Type 12.

6. Bestimmung der Phosphorsäure:

Die Messung der abgespaltenen Phosphorsäure erfolgte nach der Methode von K. SCHRIEVER, E. BAMANN und R. TOUSSAINT (28) mit Hilfe eines lichtelektrischen Colorimeters, Modell V nach B. LANGE (4).

D. Zusammenfassung

1. Präparate aus Rinderleber zeigen bei bestimmter Aufbereitung in den Aktivitäts-pH-Kurven für alkalische Phosphatase zwei oder drei Umsatzmaxima.
2. Das Auftreten mehrerer pH-Spaltungsoptima im alkalischen Bereich ist auf die Existenz zweier alkalischer Phosphatasen mit den Wirkungsoptima bei pH 9.2 und pH 9.8 zurückzuführen. Das gelegentlich zu beobachtende dritte Spaltungsoptimum hat seine Ursache darin, dass sich unter gewissen Bedingungen der absteigende Kurventeil der 9.2-Phosphatase mit dem aufsteigenden Ast der 9.8-Phosphatase zu einem dritten Maximum addiert.
3. Die Phosphatase mit dem Wirkungsoptimum bei pH 9.2 ist nur in den Mikrosomen lokalisiert, das bei pH 9.8 optimal wirksame Enzym wurde sowohl in der Zellkern- als auch in der Mikrosomen-Fraktion gefunden.
4. Durch fraktioniertes Zentrifugieren und anschliessende Aceton-Fällung war eine Isolierung der beiden Phosphatasen als Einzelindividuen möglich.
Das Auffinden der 9.8-Phosphatase in der Mikrosomen-Fraktion ist möglicherweise dem Entstehen eines Artefacts beim Homogenisieren zuzuschreiben.
5. Eine Trennung der beiden isodynamen alkalischen Phosphatasen durch blosses fraktioniertes Fällern mit Ammoniumsulfat ohne Isolierung der Zellbestandteile ist nicht möglich.
6. Viele Anzeichen sprechen dafür, dass die in Rinderleber erstmals gefundene und näher charakterisierte zweite alkalische Phosphatase mit dem Wirkungsoptimum bei pH 9.2 auch in anderen, alkalische Phosphatase führenden Organen anwesend ist.

E. Literaturverzeichnis

- (1) ALVAREZ, E. F. et M. L. TAMAYO: Biochem. J. 69, 312 (1958)
- (2) BAMANN, E. u. W. SALZER: Biochem. Z. 286, 143 (1936)
- (3) BAMANN, E. u. W. SALZER: Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 1263 (1937)
- (4) BAMANN, E. u. M. MEISENHEIMER: In BAMANN, E. u. K. MYRBÄCK:
Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig 1941, New York 1945,
S. 1605
- (5) BAMANN, E. u. J. RIEHL: Biochem. Z. 327, 136 (1955)
- (6) COHN, M.: J. biol. Chem. 180, 771 (1949)
- (7) DE DUVE, C., B. C. PRESSMANN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX a. F.
APPELMANNS: Biochem. J. 60, 604 (1955)
- (8) GIANETTO, R. a. R. VIALA: Science 121, 801 (1955)
- (9) GRYDER, R., S. FRIEDENWALD a. C. CARLSON: Arch. Biochem.
Biophysics 54, 281 (1954)
- (10) HOGEBOOM, G. H., W. C. SCHNEIDER a. G. E. PALADE: J. biol. Chem.
172, 619 (1948)
- (11) JOURNEY, L. J.: Ph.D. New York University 1957, zitiert aus Diss.
abstr. 20, 3351 (1960), L. C. Card. No Mic. 59, 6674
- (12) KNEISSL, F.: Dissertation Universität München (1956)
- (13) MATHIES, J. C.: J. biol. Chem. 233, 1121 (1958)
- (14) MORTON, R. K.: Biochem. J. 57, 231 (1954)
- (15) MORTON, R. K.: Biochem. J. 57, 595 (1954)
- (16) MORTON, R. K.: Biochem. J. 65, 674 (1957)
- (17) NEURATH, H. a. K. BAILEY: "The Proteins", New York 1953,
Vol I A, S. 54
- (18) NOVIKOFF, A. B., E. PODBER a. J. RYAN: Federat. proceed. 9, 210
(1950)
- (19) PALADE, G. E.: Arch. Biochem. Biophysics 30, 144 (1951)
- (20) PORTMANN, P.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 309, 87 (1957)
- (21) POTTER, V. R. a. C. A. ELVEHJEM: J. biol. Chem. 114, 495 (1936)
- (22) RIEHL, J., E. BAMANN u. W. STADELMANN: Arch. Pharmaz. Ber.
dtsh. Ges. 291/63, 628 (1958)

- (23) RIEHL, J.: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 318, 138 (1960)
- (24) RIEHL, J.: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 312, 249 (1958)
- (25) RIEHL, J.: Habilitationsschrift Universität München 1959
- (26) ROCHE, J.: In SUMNER, J.B. a. K. MYRBÄCK: "The Enzymes",
New York 1950, Bd. I, S. 484
- (27) SCHRAMM, G. u. O. ARMBRUSTER: Z.Naturforsch. 9b, 114 (1954)
- (28) SCHRIEVER, K., E. BAMANN u. R. TOUSSAINT: Dtsch. Apoth. Ztg.
97, 889 (1958)
- (29) STARK, G. u. W. JUNG: Arch.Gynäkol. 187, 398 (1956)
- (30) TSUBOI, K.K. a. P.B. HUDSON: Arch.Biochem.Biophysics 55, 191
(1955)

Lebenslauf

Am 6. März 1931 in Leipzig als Sohn des Kaufmanns Friedrich Gösswein und seiner Ehefrau Johanna, geb. Beyer, geboren, besuchte ich von April 1937 bis Mai 1941 die Volksschule und anschliessend das Staatliche-König-Albert-Gymnasium in Leipzig, wo ich im Sommer 1949 meine Schulzeit mit der Reifeprüfung abschloss. Es folgten vom Wintersemester 1951 bis Sommersemester 1958 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Lebensmittelchemie, im Juni 1955 das lebensmittelchemische Vorexamen und im Januar 1958 das Staatsexamen. Anschliessend begann ich - gleichzeitig mit den Diensten eines wissenschaftlichen Assistenten betraut - mit der Ausführung der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München unter Leitung seines Direktors, Herrn Prof. Dr. E. Bamann.

